جداسازی و تعیین هویت بعضی از باکتری های تجزیه کننده لیگنین و پلی ساکاریدهای کاه از دستگاه گوارش موریانه ها

دکترمحسن برجی[1] دکتر شعبان رحیمی[2*] دکترغلامرضا قربانی[3] دکترجلیل وند یوسفی[4] دکترحسن فضایلی[5]

دریافت مقاله: ۲ دی ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۱۸ اسفند ماه ۱۳۸۱

هدف: جدا سازی بعضی از گونه های باکتریایی که قادر به تجزیه لیگنین و پلی ساکاریدهای کاه گندم هستند.

طرح: طرح کاملاً تصادفی متعادل با آزمایش فاکتوریل.

حیوانات: در این آزمایش از موریانه های جمع آوری شده و همچنین از باکتری های مستخرجه از دستگاه گوارش آنها استفاده شد.

روش: با توجه به گزارشات موجود در خصوص نحوه پراکندگی و نوع موریانه های موجود در استان مرکزی با مراجعه به منطقه ساوه نمونه ها جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال یافت و بعد از شناسایی اولیه جهت تأیید به آزمایشگاه مرجع فرستاده شد. از نمونه های پرورش یافته در آزمایشگاه جهت استخراج باکتری ها با روش انتخابی استفاده شد. انواعی از لیگنین از کاه گندم استخراج گردید و همراه با کاه گندم عصاره گیری شده با آب به عنوان محیط اختصاصی در استخراج باکتری ها مورد استفاده قرار گرفت. بعد از جداسازی، باکتری ها در آزمایشگاه مرجع شناسایی شدند. تعیین منحنی رشد و دما و pH بهینه باکتری های جدا شده نیز با استفاده از روشهای موجود انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: نحوه رشد با روش آنالیز واریانس و تعیین دما وpH با استفاده از طرح کاملاً تصادفی متعادل و آزمایش فاکتوریل انجام شد.

نتایج: موریانه های جمع آوری شده به عنوان موریانه های ***Anacanthotermes vagans*** مورد شناسایی قرار گرفتند. سه نمونه از باکتری های جدا شده که بعداً به عنوان گونه هایی از جنسهای *باسیلوس*، *انتروباکتر* و *آکروباکتریوم* مورد شناسایی قرار گرفتند قادر به استفاده از هر سه نوع لیگنین و کاه گندم عصاره گیری شده بودند و می توانستند از این مواد به عنوان تنها منبع کربن استفاده نمایند. در بین باکتری های جدا شده گونه انترو باکتر دارای بیشترین میزان رشد بود که سریعتر از دو گونه دیگر نیز به حداکثر رشد خود رسید. اثرات pH و درجه حرارتهای مختلف بر فعالیت باکتریایی نشان داد که گونه های جدا شده در محیط مواد خشبی، pHدر محدوده خنثی و دمای حدود ۴۰ درجه سانتیگراد را ترجیح می دهند.

نتیجه گیری: باکتری های جدا شده در این مطالعه تجزیه بیولوژیکی کاه گندم و سایر فرآورده های بیولوژیکی دارای لیگنین مشابه با کاه گندم که به عنوان ضایعات هستند را آسان می سازند. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۳، ۲۵۶-۲۴۹.

واژه های کلیدی: جدا سازی، تعیین هویت، باکتری ها،لیگنین، پلی ساکاریدها، موریانه ها.

۱) دانش آموخته دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی پرورش و مدیریت تولید طیور دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.
۳) گروه آموزشی علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان - ایران.
۴) مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، کرج - ایران.
۵) مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج - ایران.
*) نویسنده مسؤول rahimi_S80@yahoo.com

Isolation and identification of some bacteria from termites Gut capable in degrading straw lignin and Polysaccharides

Borji, M.,[1] Rahimi, Sh.,[2] Ghorbani, G.,[3] Vand yoosefi, J.,[4] Fazaeli, H.[5]

[1]*Graduated from the Faculty of Agricultural, University of Tarbiat Modarres Tehran-Iran.* [2]*Department of Poultry Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran.* [3]*Department of Animal Sciences, Faculty of Agricutlure, Esfahan Industrial University, Esfahan-Iran.* [4]*Razi Research Institute in Vaccine and Serum Production, Karaj-Iran.* [5]*State Animal Science Researche Institute, Karaj-Iran.*

Objective: Isolation of some bacteria species capable of degrade wheat straw lignin and polysaccharides.

Design: Completely rondomizied design with factorial experiment.

Animals: The collected Termites including bacteria from their guts.

Procedure: Presenting reports related to distribution pattern and species of Termites in Markazy province (Saveh area) in Iran. The collected samples(Termites) were transported to the diagnostic laboratory for primary identification. Then, samples were sent to the reference laboratory in Ontario, Canada for further identification approval. From cultured Termites in laboratory bacteria were isolated by selection method. Kinds of lignin was extracted from wheat straw were used as specific media in isolation of bacteria. After isolation of bacteria, they identified by our and then by reference laboratory. Determination of growth curve and optimum temperature and pH for isolated bacteria performed by present methods.

Stastical analysis: Growth curve, ANOVA, optimum pH and temperature by CRD design and factorial experiment were analysied.

Results: The collected Termites were identified as *Anacanthotermes vagans*. Three of the isolates, tentatively identified as *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, and *Ocrobacterium sp.*, were capable of utilizing all three lignin preparations as well as extracted wheat strawas a sole source of carbon. Between the selected bacteria, *Enterobacter* had more and faster growth rate than the other two species. The results showed that the isolated bacteria prefer 40^{oc} and nuetral pH for their growth.

Conclusion: The isolated bacteria makes the biodegradation of wheat straw and other similar lignin containing biological waste products commercially feasible. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 3: 249-256, 2003.***

Key words: Isolation, Idetification, Bacteria, Lignin, Poly saccharides, Termites.

Corresponding author email:rahimi_S80@yahoo.com

اجزای عمده الیاف خام شامل سلولز (۵۰-۲۸ درصد) همی سلولز (۳۰-۲۰ درصد) و لیگنین (۳۰-۱۸ درصد) می باشد که در گیاهان چوبی لیگنین بیشتر است این ترکیبات همراه با هم به عنوان پلیمرهای ساختمانی در دیواره های سلولی و تیغه های میانی بیشتر گیاهان عالیتر وجود دارند (۱۶).

لیگنین ترکیبی از پلیمرهای فنیل پروپانویید است که در دیواره های سلولی گیاهان ذخیره می شود پیش سازهای لیگنین سه نوع الکل حلقوی کوماریل، کونیفریل و سیناپیل می باشد که به ترتیب تشکیل واحدهای P- کوماریل، گوایی آسیل و سیناپیل- پروپان را می دهند. این پیش سازها به وسیله انواع متنوعی از اتصالات در پلیمر نهایی وجود دارند (۴۰). لیگنین بسته به نوع گیاه، یا بافت گیاهی و بسته به میزان مونولیگنول ها و درجه متوکسی لاسیون آنها می تواند تنوع زیادی داشته باشد (۱۸،۳۹).

تجزیه بیولوژیکی لیگنین یکی از بزرگترین فرآیند های باز چرخ مواد در چرخه کربن اکسیژن محیط زیست می باشد (۲۷،۲۹) که توسط میکروبها در خاک، مواد رسوبی و دستگاه گوارش موجودات بی مهره خاکزی و سایر

حیوانات (از جمله نشخوارکنندگان) اتفاق افتاده و به طور کلی تحت دو سیستم مجزا که یکی وابسته به حضور مولکول اکسیژن و دیگری بدون حضور آن است انجام می شود (۱۷).

از بین موجودات بی مهره خاکزی، موریانه ها یکی از گروه های بسیار مهم هستند که به اتفاق جمعیت میکروبی همزیست شان بخش متنابهی از سلولز (۹۹-۷۴ درصد) و همی سلولز (۸۷-۶۵ درصد) مواد گیاهی خورده شده را تجزیه می نمایند (۱۶).

تا سال ۱۹۶۳ اعتقاد به این بود که موریانه ها مقادیر قابل توجهی از لیگنین را هضم نمی نمایند، اما در این سال انجام مقایسه ای در خصوص مقادیر لیگنین چوب و مدفوع نشان داد که موریانه ها حداقل می توانند لیگنین را متیل زدایی (یکی از فرآیند های تجزیه لیگنین) نمایند (۳۷).

Buckerfield و Butler با انجام تکنیک جمع آوری $14CO_2$ بازدم شده به وسیله موریانه های تغذیه شده با لیگنین های مصنوعی و طبیعی و همین طور ترکیبات مرتبط با آن پیشنهاد نمودند که هضم لیگنین در دستگاه گوارش این موجودات انجام می شود. بنابراین تجزیه بیولوژیکی لیگنین به وسیله موریانه ها نقش مهمی در چرخه کربن بر عهده دارد، چرا که جمعیت موریانه های جهان $۲/۴\times۱۰^{۱۷}$ می باشد و توانایی تولید CO_2 به وسیله این موریانه ها ۵×۱۰^{۱۶} گرم تخمین زده می شود (۳۷).

در گزارشی که در مورد وضعیت تجزیه لیگنین انجام شده، نشان داده شد که تولید $14CO_2$ از مواد لیگنوسلولزی نشاندار خورد شده به وسیله موریانه های ناسوتی ترمس اگزیتیوسوس بعد از جدا کردن سر موریانه ها تفاوتی با گروه شاهد نداشت، این بدان معنا است که فعالیتهای مشاهده شده در خصوص تجزیه لیگنین احتمالاً مستقل از متابولیسم حیوان میزبان بوده (موریانه) و به فعالیت میکروارگانیسم های دستگاه گوارش مربوط می شود (۲۲). بر همین اساس توجه به بررسی نقش میکروارگانیسم ها در تجزیه لیگنین جلب شد.

در کل مشخص شده که سه گروه از موجودات قادر به تجزیه بیولوژیکی لیگنین هستند. اینها شامل قارچهای پوسیدگی، بعضی از میکروارگانیسم های خاک و آب و موریانه ها هستند (۳۷). در سالیان اخیر توجه زیادی به نقش باکتری ها در تجزیه لیگنین جلب شده است (۲۹،۳۸،۴۴).

Phelan و همکاران اعتقاد دارند که به دلیل توانایی مشخصتر قارچهای پوساننده چوب و همچنین به این دلیل که تکنیکهای قابل استفاده برای تعیین کمیت تجزیه لیگنین حساسیت کافی برای مطالعه اثر باکتری ها بر تجزیه لیگنین را ندارند، نقش باکتری ها به خوبی شناخته نشده است (۴۷). اما استفاده از تکنیک سنجش 14_C برای ارزیابی تجزیه لیگنین تا حدود زیادی این مشکلات را مرتفع ساخته است (۲۶،۳۶).

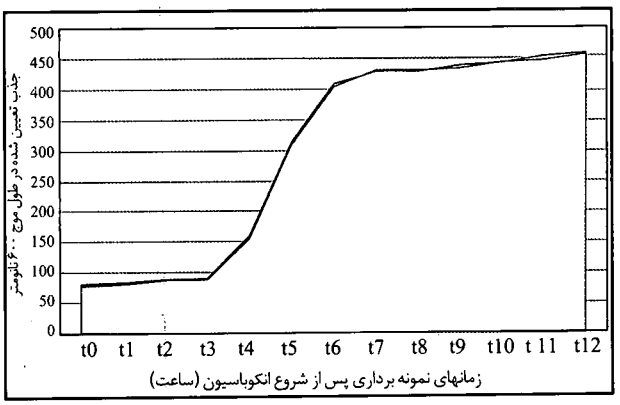
در خصوص تجزیه باکتریایی لیگنین توسط گونه های مختلف تاکنون مطالعات زیادی صورت نگرفته اما آنچه انجام شده توجه زیادی را جلب نموده است. باکتری های مورد مطالعه از محیط های مختلفی مثل خاک و آب (۲۵،۲۷،۲۸) مواد در حال پوسیدگی گیاهی (۲۴،۴۷) رسوبات سواحل دریایی خاک (۱۱،۱۳،۲۹،۳۱،۴۴،۴۹) انواع مواد خشبی در حال پوسیدگی (۱۴،۳۸)، مواد کودی در حال پوسیدگی (۳۴)، خمیرهای کاغذ سازی (۵۳) و موریانه ها (۳۷) جدا شده اند.

در این مورد Crawford و Crawford عنوان نموده اند که تجزیه میکروبی اجزای لیگنینی در برخی خاکها و همین طور کشتهای خالص باکتری های گرمادوست سلولولتیک مشاهده شده است (۲۵). Crawford و همکاران که در مطالعه خود تجزیه کرافت لیگنین ها و لیگنین های طبیعی را به وسیله میکروفلور خاک و آب با استفاده از تکنیک $14CO_2$ مورد بررسی قرار می دادند نتیجه گرفتند که اولاً کرافت لیگنین به تجزیه مقاومتر بوده و ثانیاً وزن مولکولی اثر زیادی بر میزان تجزیه دارد به علاوه حداکثر تجزیه لیگنین در خلال ۲۰۰-۱۰۰ ساعت شروع انکوباسیون اتفاق افتاده است (۲۷). Crawford و همکاران در مطالعه دیگری نشان دادند که اگرچه تجزیه لیگنین و سلولز هر دو به وسیله میکروارگانیسم های خاک اتفاق می افتد تجزیه لیگنین ۴ تا ۱۰ برابر آهسته تر از تجزیه سلولز است (۲۸). در مطالعه دیگری برای اولین بار Crawford نشان داد که سویه هایی از استرپتومایسزها قادر به تجزیه سلولز و همچنین لیگنین می باشند. این دانشمند نشان داد که ۷ تا ۱۷ درصد لیگنین چوب به شکل $14CO_2$ قابل بازیافت می باشد (۲۴). قبل از آن Crawford نشان داده بود که بعضی از گونه های اکتینومیست گرما دوست احتمالاً قادر به تجزیه لیگنوسلولز هستند و در ابتدا اجزای کربوهیدراتی را تجزیه می نمایند، همچنان که بعضی از باکتری های (باکتری های حقیقی) گرم منفی و بعضی از گونه های نوکاردیا قادر به تجزیه لیگنین هستند (۲۳). Phelan و همکاران در مطالعه خود از آزمایش Crawford و Robinson ذکر نموده اند که یک سویه از *باسیلوس مگاتریوم* جدا شده از مواد گیاهی در حال پوسیدگی قادر به تجزیه سریع اجزای زنجیر جانبی لیگنین های طبیعی در لیگنوسلولز بوده و به آرامی نیز می توانند اجزاء حلقه در هیدروپلیمرها را تجزیه نماید. Phelan و همکاران که خود بر روی سویه هایی از استرپتو مایسزها مطالعه می کردند نشان دادند که سویه هایی از این باکتری ها می توانند مقادیر قابل توجهی از لیگنین و گلوکان را به محصولات محلول در آب تجزیه نمایند (۴۷). استرپتومایسزها از گونه هایی هستند که توان تجزیه کنندگی لیگنین توسط آنها در آزمایشات مختلفی ثابت شده است (۹،۱۱،۱۲،۱۳،۲۹، ۳۰،۳۱،۳۲،۳۳،۳۴،۴۱،۴۸،۴۹،۵۰). در حالی که مطالعه بر روی فعالیت تجزیه کنندگی لیگنین توسط گونه های دیگر نیز به اثبات رسیده است. از آن جمله می توان به مطالعه Odier و همکاران اشاره نمود. آنها در آزمایش خود نشان دادند که لیگنین دی اکسان و لیگنین چوب آسیاب شده بعد از ۷ روز به میزان ۲۰ تا ۴۰ درصد به وسیله باکتری های هوازی گرم منفی از خانواده Pseudomonadaceae و Neisseriaceae تجزیه شده اند (۴۴). Kerr و همکاران نیز در بررسیهای خود گونه هایی از Arthrobacter را جدا کردند که بر روی انواعی از لیگنین به عنوان تنها منبع کربن قابلیت رشد داشته و بعد از ده روز دوره انکوباسیون ۶/۵ درصد اجزای پلی ساکاریدی و ۲/۹ درصد اجزای لیگنینی را تجزیه نموده است (۳۸).

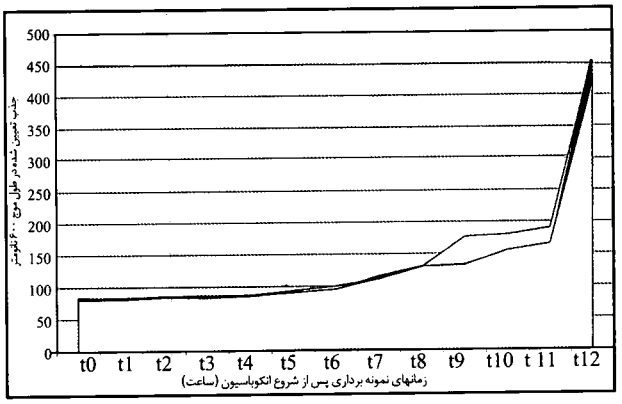
در مطالعه Kato و همکاران که از مجموع باکتری های دستگاه گوارش موریانه استفاده شده نشان داده شد که این باکتری ها قادر به تجزیه ۲۸ درصد از لیگنین دی آلکالیزه و از ۶۰ تا ۹۵ درصد دیمرهای لیگنین می باشند (۳۷).

در بررسی O'Brien و Slaytor عنوان شده که از حدود ۲۰۰۰ گونه از موریانه های موجود فقط تعداد کمی از نظر فلور غالب دستگاه گوارش مورد بررسی قرار گرفته اند ولی در عین حال جنسهایی از استرپتوکوکوس، استافیلوکوکوس، انتروباکتر، سیتروباکتر، باسیلوس، آرتروباکتر، آلکالیژن، سراشیا و باکتری های نوع اکتینومسیت شناسایی و جداسازی شده اند (۴۳).

بدین ترتیب می توان دریافت که اولاً توان تجزیه کنندگی لیگنین علاوه بر قارچها در باکتری ها نیز وجود دارد که گا هی نیز بسیار بالا می باشد. این مسئله بخصوص زمانی که از اجتماع باکتری ها استفاده می شود بسیار واضحتر



نمودار ۱ - منحنی رشد باکتری گونه انتروباکتر.



نمودار ۳ - منحنی رشد باکتری باسیلوس.

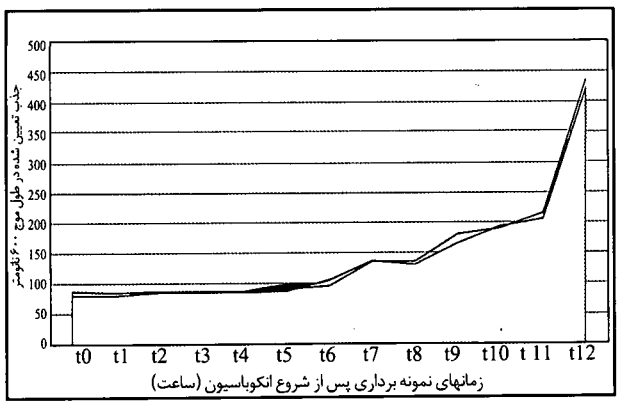
است. در ثانی بسیاری از گونه های باکتریایی که توان تجزیه کنندگی لیگنین در آنها به اثبات رسیده در دستگاه گوارش موریانه ها نیز وجود دارند که بر همین اساس و نیز از آنجایی که توان تجزیه لیگنین در موریانه ها نیز به اثبات رسیده، موریانه های از گونه های مختلف منابع بسیار خوبی جهت جداسازی و مطالعه باکتری های تجزیه کننده لیگنین به نظر می رسند.

مطالعه حاضر به منظور جدا سازی و شناسایی باکتری هایی از دستگاه گوارش موریانه های پست که قادر به تجزیه لیگنین و شکستن اتصالات لیگنینی پلی ساکاریدی مواد خشبی هستند، انجام گرفت.

مواد و روش کار

الف- جمع آوی نمونه و پرورش موریانه ها: با توجه به گزارشهای موجود درخصوص نحوه پراکندگی و نوع موریانه های موجود در استان مرکزی (۸) با مراجعه به ناحیه زرند منطقه ساوه نمونه های لازم جمع آوری شد و در شیشه های دردار محتوی الکل اتیلیک ۷۵ درصد قرار داده شدند و به آزمایشگاه انتقال یافتند. پس از شناسایی اولیه در حد جنس با استفاده از کلیدهای موجود، نمونه ها جهت تأیید تشخیص جنس و همین طور تشخیص گونه به دانشگاه تورنتو ارسال گردید. نمونه های مطالعه حاضر توسط دکتر Timoty G. Myles در دانشکده جنگل و بر اساس برنامه حشره شناسی اوربان مورد بررسی قرار گرفت (۱).

جهت استفاده موریانه ها در مطالعات بعدی و برای جدا کردن دستگاه گوارش و باکتری های همزیست از ظروف شیشه ای استوانه ای به قطر ۱۵ و ارتفاع ۳۰ سانتیمتر منظور پرورش آزمایشگاهی موریانه ها استفاده شد. به این ترتیب که تقریباً تا حدود نصف ظرف با خاک پر شد و تقریباً ۲ تا ۳



نمودار ۲ - منحنی رشد باکتری گونه آکروباکتریوم.

سانتیمتری سطح خاک نیز به وسیله مواد خشبی پوشانده شد. برای تأمین رطوبت خاک دو لوله شیشه ای در اعماق ۵ و ۱۰ سانتیمتری خاک قرار داده شد که هر هفته چند میلی لیتر آب به داخل هر کدام از لوله ها ریخته می شد. همچنین گاهی اوقات چند قطره آب مستقیماً بر روی خاک ریخته می شد. برای تأمین رطوبت در فضای هر ظرف از بالشتکهایی استفاده شد که از چوبهای نازک پنبه پیچی شده تهیه شده بود و بر روی سطح خاک قرار داشت و هر ۳-۲ روز یکبار مر طوب می شد. نهایتاً همه ظروف در درون انکوباتورهای تاریک با دمای ۱±۳۰ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵ ± ۶۰ درصد نگهداری شدند تا در مواقع لزوم نمونه های موریانه جهت عملیات بعدی از آنها اخذ گردد.

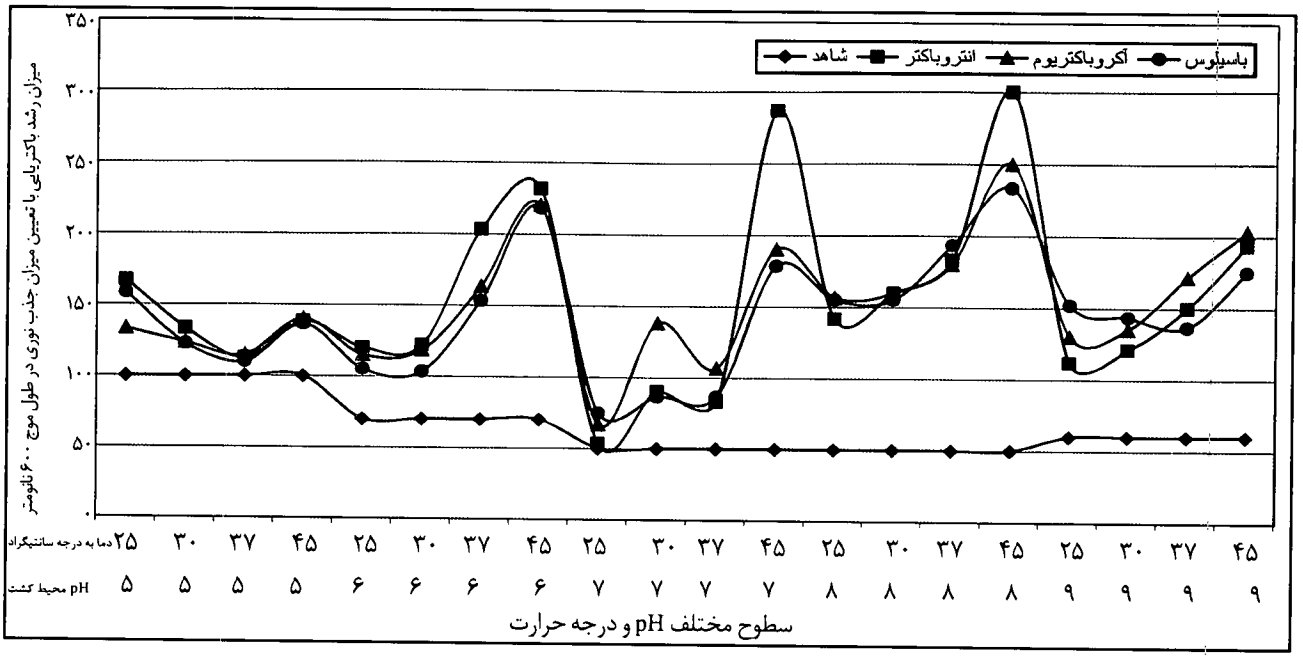
ب- تهیه لیگنین: کاه گندم، کاه جو و خاک اره (به علت داشتن لیگنین زیاد) مورد استفاده قرار گرفتند. کاه تهیه شده با استفاده از آسیاب تا اندازه ۰/۵ سانتیمتر خرد شد. قبل از استفاده از آن به عنوان سوبسترای رشد، کاه چندین بار به منظور جدا کردن مواد محلول در آب (عمدتاً کربوهیدراتهای محلول) با آب جوش عصاره گیری شد (به نحوی که در آخرین مرحله آب بدون تغییر رنگ باشد) و برای ۲۴ ساعت در ۷۰ درجه سانتیگراد خشک شد. لیگنین از کاه با سه روش مختلف استخراج شد (۳۸).

۱-لیگنین دی اکسان: کاه خرد شده با ابعاد ۰/۵ سانتیمتر در یک سوکسوله قرار داده شد و برای ۵۰ ساعت با اتانول بنزن (۱:۱) در حال جوش عصاره گیری شد و سپس در داخل یک دسی کاتور خشک شد. در ادامه کاه عصاره گیری شده برای ۱۲ ساعت با محلول در حال جوشی متشکل از دی اکسان آب (۱:۹) دارای معادلی از اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال عصاره گیری گردید. عصاره تغلیظ شده و لیگنین در آب مقطر رسوب داده شد. لیگنین رسوب داده شده سه مرتبه با آب شسته وخشک شد و سپس دوباره با اترنفت شسته شد.

۲-لیگنین کلیسون: کاه عصاره گیری شده با آب (همچنان که در بالا توصیف شد) با اسید سولفوریک ۷۲ درصد در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد برای ۲ ساعت فرآوری شد. مخلوط به وسیله آب مقطر تا ۳ درصد غلظت اسید رقیق شد و این عمل تا ۴ ساعت ادامه یافت. بقایا کاملاً با آب شستشو داده شد.

۳-لیگنین اسیدهیدروکلریدریک: کاه آسیاب شده تا ۰/۵ سانتیمتر با استفاده از اسید هیدروکلریدریک (با وزن مخصوص ۱/۱۹ در دمای ۵ درجه سانتیگراد) در دمای ۵ درجه سانتیگراد برای ۲ ساعت با استفاده از یک همزن مغناطیسی فرآوری شد. اجازه داده شد تا درجه حرارت به دمای اطاق برسد. به مخلوط یخ اضافه شد و پس از صاف نمودن خشک شد.

لیگنین و کاه (عصاره گیری شده با آب جوش) در غلظت ۰/۵ گرم در لیتر در هر دو محیط کشت جامد و مایع مورد استفاده قرارگرفتند. کاه مورد



نمودار ۴ - اثرات درجه حرارت pH مختلف بر رشد گونه های مختلف باکتریایی جدا شده.

استفاده در محیط کشت مایع تا اندازه ۰/۵ میلی متری آسیاب شد. لیگنین ها و کاه مورد استفاده در محیط کشت جامد پس از حل کردن در سود ۰/۲۵ نرمال (۰/۵ گرم لیگنین یا کاه در هر ۱۰ میلی لیتر سود) به محیط کشت پایه استریل یا محیط M9 (۶/۲ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات، ۳ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۱ گرم کلرید آمونیوم و ۰/۵ گرم کلرید سدیم در هر لیتر آب شیر) اضافه شد. برای خنثی کردن سود مقدار معادلی از اسید کلریدریک ۰/۲۵ نرمال استریل نیز به محیط کشت اضافه شد.

ج- جداسازی دستگاه گوارش و تعیین pH روده کامل: برای جدا کردن دستگاه گوارش موریانه های مورد استفاده در این آزمایش از روش تغییر یافته Kato و همکاران استفاده شد (۳۷). بدین ترتیب که پس از انتقال ۲۰ موریانه بر روی یک پلت شیشه ای ابتدا یک تکه پنبه را به اتر آغشته نموده و چند ثانیه در داخل پتری با پوشاندن درب آن قرار دادیم . پس از بیهوش شدن موریانه ها سطح بدن آنها به وسیله اتیل الکل ۹۵ درصد کاملاً شستشو داده شد تا بدین وسیله سطح بدن آنها کاملاً استریل گردد. اتیل الکل سطح بدن به وسیله شستن موریانه ها در محیط ("TB" Terrific broth) استریل حاوی ۳۰۰ میلی گرم لیگنین در هر میلی لیتر دو مرتبه کاملاً شستشو داده شد. محیط TB متشکل از دو گرم سدیم آمونیوم هیدروژن فسفات ۴ آبه، یک گرم دی هیدروژن پتاسیم فسفات، ۰/۳ گرم سولفات منیزیم هفت آبه، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم و ۰/۰۰۲ گرم کربنات کلسیم در هر لیتر آب مقطر بود.

بعد از شستن موریانه ها با محیط TB، روده به وسیله یک جفت پنس نوک تیز از بدن خارج شد و در یک لوله آزمایش استریل محتوی ۵ میلی لیتر از محیط TB دارای ۳۰۰ میلی گرم لیگنین در هر میلی لیتر کاملاً له شده و هموژنیزه گردید تا بدین وسیله یک مخلوط آبکی حاوی محتویات روده موریانه ها تهیه گردد. برای نگهداری امولسیون تهیه شده از دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوباتور استفاده شد. برای اندازه گیری pH روده روش استخراج همانند روش ذکر شده بود با این تفاوت که بخشهای کامل روده ۴۰ حشره بالغ جمع آوری و در ۶ میلی لیتر از آب مقطر هموژنیزه شد. سپس با استفاده از یک الکترود نازک pH متر دیجیتالی (Jenway 3020, UK) نسبت به ثبت pH اقدام شد.

د- جداسازی باکتریهای تجزیه کننده لیگنین: از آنجایی که به طور کلی جهت بازیافت سویه ها یا گونه های باکتریایی موردنظر دو روش غربالگری و انتخاب مورد استفاده قرار می گیرد و نیز از آنجایی که روش انتخاب روش آسانتری است در این آزمایش از روش انتخاب استفاده شد (۵۱). بدین ترتیب که دو نوع محیط کشت مختلف مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت مایع حاوی محیط M9 به عنوان محیط پایه و یکی از سه نوع لیگنین و یا کاه گندم به عنوان ماده مغذی، و همین طور محیط کشت جامد حاوی، آگارلیگنین و یا آگار کاه گندم . پس از تهیه امولسیون در هر سری کشت، ۴۰ لوله آزمایش در کشتهای مایع و ۴۰ پلیت در کشتهای جامد تهیه شد که هر ۱۰ عدد به عنوان تکرار به کاه یا یکی از ۳ نوع لیگنین اختصاص یافت. در محیطهای کشت مایع (یک لیتر محلول M9 به اضافه ۰/۵ گرم لیگنین یا کاه گندم) یک میلی لیتر از امولسیون تهیه شده روده اضافه شد. بر روی پلیت های محتوی آگار- لیگنین یا آگار- کاه گندم نیز ۰/۱ میلی لیتر از امولسیون روده قرار داده شد همه محیطهای مایع در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباتور به مدت یک هفته قرار داده شده و روزانه یکبار محیطهای مایع به روش دستی هم زده می شد. رشد باکتری بر روی پلیت های آگاردار مورد بررسی قرار گرفت. جهت تأیید وجود باکتری در کشتهای مایع در روز سوم انکوباسیون نمونه هایی برداشت گردید که بخشی از آن به پلیت های محتوی Count agar منتقل شد و قسمتی نیز برای تهیه اسلاید با روش رنگ آمیزی گرم مورد استفاده قرار گرفت. در طول دوره انکوباسیون دائماً نحوه رشد باکتری ها با استفاده از این دو روش مورد بررسی قرارگرفت. باکتری هایی که توانایی رشد بر روی هر سه نوع لیگنین و همچنین کاه گندم را داشتند انتخاب و با استفاده از روش بیوشیمیایی و همچنین کیت های موجود BBL Crystal Enteric/ Nonfermenter ID- Kit, CtN., of 20, USA ابتدا مورد شناسایی اولیه قرار گرفت و سپس برای تأیید تشخیص به آزمایشگاه مرجع (Accugen Laboratories, INC, USA) ارسال شد. در آنجا نیز با استفاده از سیستمهای API (Analytical Profile Index from- Biomerieux, INC. USA) و Walk-away (Baxter Diagnostics, INC. Canada) تأیید تشخیص و بررسی خصوصیات شد (۲۱،۴۲).

ه- تعیین منحنی رشد: برای تعیین منحنی رشد باکتری های جدا شده ۹ عدد ارلن ۲۵۰ سی سی انتخاب و به هرکدام از آنها ۱۰۰ سی سی محیط آبگوشتی BHI اضافه شد. ارلن ها به ۳ گروه سه تایی (به عنوان تکرار) تقسیم شده و سپس به هر سری سه تایی از ارلن ها ۱۰ کلنی از هرگونه باکتریایی با استفاده از لوپ نمونه برداری اضافه شد در زمان صفر (زمان اضافه کردن کلنی های میکروبی) به وسیله اسپکتروفوتومتر میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. سپس همه ارلن ها به بن ماری ۳۵ درجه سانتیگراد منتقل شده و پس از یکساعت نمونه هایی از ارلن ها برداشته شد و میزان جذب آنها قرائت گردید. عملیات برداشت نمونه و قرائت جذب با فواصل زمانی یک ساعت و تا ۱۲ ساعت ادامه یافت. منحنی رشد با استفاده از داده های بدست آمده از جذب رسم گردید (۲۱).

و- تعیین دما و pH مناسب رشد باکتریها: برای تعیین pH و دمای بهینه رشد باکتریها از محیط M9 حاوی یک درصد لیگنین اسید کلریدریک خاک اره به عنوان محیط پایه استفاده شد. از چهار نقطه دمایی ۳۷،۳۰،۲۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد و پنج pH مختلف ۵، ۶، ۷، ۸، و ۹ در این آزمایش استفاده شد. از آنجایی که باکتریهای مورد بررسی از دستگاه گوارش موریانه ها جدا شده اند و از آنجایی که محدوده دمایی و pH موجود در بخشهای مختلف دستگاه گوارش حد اکثر میتواند در چنین محدوده هایی تغییر نماید این شرایط دما و pH مورد آزمون قرار گرفت. تنظیم pH محیط به وسیله سود و اسید کلریدریک یک نرمال و تحت کنترل pH متر دیجیتالی (Jenway 3020, UK) صورت گرفت. در این آزمایش از یک طرح پایه کاملاً تصادفی با آزمایش فاکتوریل ۳×۵×۴×۳ که در آن گونه باکتری با سه سطح، دما با چهار سطح، فاکتور pH با پنج سطح و سه تکرار استفاده شد. در هر لوله آزمایش ۱۵ میلی لیتر از محیط پایه استریل گردید و سپس ۱ میلی لیتر از امولسیون تهیه شده هر گونه باکتری به آن اضافه شد. پس از دو هفته مدت زمان انکوباسیون (که هر روز لوله ها به صورت دستی به هم زده می شد و هر سه روز یکبار میزان کدری کنترل می شد) میزان کدری در طول موج ۶۰۰ نانومتر مقایسه شد. جهت خواندن جذب ابتدا لوله ها کاملاً به وسیله شیکر مخلوط شده سپس با طی یک مدت زمان ۳۰ دقیقه ای اجازه به ته نشینی مواد جامد داده می شد و از محلول رویی جهت خواندن جذب استفاده می شد.

نتایج

بررسیهای انجام شده بر روی گونه های جمع آوری شده نشان داد که موریانه های مورد استفاده در این مطالعه متعلق به رده حشرات، راسته ایزوپترا، خانواده هودوترمیتیده، جنس آناکانتوترمس و گونه واگانز (هاژن) می باشد.

در خصوص تعیین pH نتایج اندازه گیری pH در مخلوط هموژن روده که سه بار بر روی سه نمونه متفاوت از موریانه های انتخاب شده از کلنی های طبیعی و ظروف پرورش بود مقادیر ۶/۰۲، ۵/۹۶ و ۶/۰۱ با میانگین ۶ را نشان داد. از میان گونه های متعدد باکتریایی که بر روی انواعی از لیگنین و مواد خشبی رشد نمودند نهایتاً سه گونه از جنسهای متفاوت به نامهای انتروباکتر کلوآکا، آکروباکتریوم آنتروپی و باسیلوس اسفریکوس جداسازی، خالص سازی و با استفاده از روشهای مختلف مورد شناسایی قرار گرفت. این سه گونه بر روی تمام محیط های حاوی انواع لیگنین و همچنین کاه گندم، کاه جو و خاک اره توانایی رشد داشتند. آزمایشات بیوشیمیایی، واکنشهای تخمیری، حساسیت به آنتی بیوتیک و حساسیت به رنگها در ارتباط با هر گونه انجام شد.

جدول ۱ - جدول تجزیه واریانس مربوط به آزمایش و نمودار تعیین pH و دمای بهینه رشد باکتری ها.

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار برآورد شده F	Pr>F
A (pH)	۴	۶۶۶۳۱/۱۴	۱۶۶۵۷/۷۸	۸۰/۲۶**	۰/۰۰۰۱
B (دما)	۳	۱۵۰۹۴۴/۰۱۲	۵۰۴۳۱/۶۷	۲۴۲/۴۲**	۰/۰۰۰۱
C (باکتری)	۳	۳۲۰۹۳۵/۶۴	۱۰۶۹۷۸/۵۴	۵۱۵/۴۲**	۰/۰۰۰۱
A*B	۱۲	۷۰۵۹۹/۷۵	۵۸۸۳/۳۱	۲۸/۳۵**	۰/۰۰۰۱
A*C	۱۲	۵۹۶۱۳/۲۹	۴۹۶۷/۷۷	۲۳/۹۳**	۰/۰۰۰۱
B*C	۹	۶۳۶۳۸/۵۷	۷۰۷۰/۹۵	۳۴/۰۷**	۰/۰۰۰۱
A*B*C	۳۶	۴۹۸۸/۳۴	۱۳۸۵/۶۵	۶/۶۸**	۰/۰۰۰۱

منحنی رشد گونه های باکتریایی جدا شده به ترتیب در نمودارهای ۲،۱ و ۳ نشان داده شده است. از آنجایی که حداقل زمان لازم تا رسیدن به حداکثر تعداد برای هر گونه مد نظر بوده و نیز از آنجایی که از روش اسپکترو فوتومتری برای بررسی رشد استفاده شده، زمان رشد فقط تا مرحله فاز ثابت (Stationary phase) در نظر گرفته شده است. بنابراین منحنیها مراحل تأخیری (Lag Phase) و لگاریتمی (Log Phase) رشد را نشان می دهند. همچنان که در این نمودارها قابل مشاهده است گونه انتروباکتر کلوآکا در زمان کمتری مراحل تأخیری و لگاریتمی را طی نموده و سریعتر به فاز ثابت رسیده است در حالی که این زمان برای گونه های آکروباکتریوم آنتروپی و باسیلوس اسفریکوس بیشتر و برای دو گونه اخیر تقریباً شبیه به هم می باشد.

نتایج مربوط به انتخاب بهترین دما و pH، بر رشد سه گونه باکتریایی در نمودار ۴ نشان داده شده است. تجزیه آماری هر یک از فاکتورها نشان داد که در بین پنج سطح مختلف pH (۵،۶،۷،۸،۹) pH ۸ مناسبترین pH رشد باکتری ها است. همچنین از بین چهار سطح دمایی (۳۰،۲۵، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتیگراد) دمای ۴۵ درجه سانتیگراد تأثیر بهتری بر رشد باکتری ها داشته است. از بین سه گونه باکتریایی نیز همچنان که در منحنیهای رشد عنوان شد ابتدا انتروباکتر، بعد از آن اکروباکتریوم و در مرحله آخر باسیلوس قرار دارد. اگر چه اختلاف معنا داری بین سه گونه مشاهده نشد ولی هر سه گونه با گروه شاهد (بدون باکتری) اختلاف معنا دار نشان دادند. نتایج به دست آمده با گزارشهای بسیاری از محققین تطابق دارد (۳۸،۴۶،۴۸،۵۳).

بحث

وجود گونه موریانه مزبور در استان توجه به گونه غالب موریانه پست موجود در کشور که در گزارشهای دیگر نیز به آن اشاره شده است را جلب می نماید (۲،۴،۸). در این بین بخصوص گونه *آناکانتوترمس واگانز* (هاژن) یک گونه همه جایی نامیده می شود که تقریباً در تمام مناطق و اقلیم های کشور وجود داشته و در منطقه مرکزی فراوانی زیادی دارد. از درختان غیرمثمر مهم میزبان این گونه می توان به تاغ اشاره نمود که درشهرستان ساوه و ناحیه مأمونیه می توان آن را یافت. به علاوه گذشته از درختان مثمری همچون گز و خرما موادی مثل چوب، کاغذ، کارتن، کنف، فاستونی و مدفوع حیوانات اهلی و وحشی نیز منابع مهمی برای این گونه از موریانه محسوب می شود (۶). عبدالرزاق و همکاران نیز یکی از گونه های غالب موریانه ها در مراتع قم را همین گونه معرفی می نمایند (۵). محققین دیگر نیز جمعیت غالب موریانه در استان مرکزی و بخصوص منطقه مأمونیه را جنس *آناکانتوترمس* (۷) و گونه *واگانز* (۳) می دانند.

در خصوص pH روده نتا یج این مطالعه با گزارشهای محققین دیگر از جمله O'Brien و Slaytor هما هنگی دارد (۴۳). این محققین بخشهای

مختلف روده ۱۶ گونه موریانه را مورد بررسی قرار داده و عنوان نمودند که در قسمت انتهایی دستگاه گوارش (شامل پانچ و کولون) بیشتر گونه ها، pH در دامنه ۷/۵-۶ قرار دارد. بنابراین شرایط در قسمت انتهایی دستگاه گوارش مطلوب رشد بسیاری از میکروارگانیسم ها ست که معمولاً مقادیر pH از ۶ تا ۹ را تحمل می کنند. قسمت میانی دستگاه گوارش یعنی جایی که ترشح آنزیمها اتفاق می افتد نیز معمولاً دارای pH نزدیک به خنثی است. با توجه به نتایج این محققین حتی در بین گونه ها نیز احتمالاً اختلافاتی از نظر pH وجود دارد که می تواند مربوط به علل دیگری از جمله عادات غذایی و نوع ماده غذایی مورد استفاده باشد. بر همین اساس O'Brien وSlaytor، pH بخش جلویی، بخش میانی و بخش انتهایی دستگاه گوارش موریانه های آناکانتو ترمس آنجریانوس را به ترتیب ۷/۷ ، ۶/۹ و ۷/۹ گزارش نموده اند در صورتی که بخش انتهایی دستگاه گوارش در موریانه های *آناکانتوترمس ترکستانیکوس* pH ۷/۷ دارد.

بر اساس نظر O'Brien وSlaytor ۲۰۰ گونه از موریانه ها وجود دارند که فقط تعداد کمی از آنها از نظر فلور روده مورد بررسی قرار گرفته اند (۴۳). *آناکانتوترمس واگانز* یکی از گونه هایی است که متأسفانه در خصوص فلور روده آن گزارشی در دست نمی باشد. نکته جالب توجهی که در این مورد وجود دارد این است که اگر چه بخش انتهایی دستگاه گوارش بیهوازی است، نسبت بالایی از باکتریهای جدا شده از این قسمت باکتری های هوازی - بیهوازی اختیاری هتروتروف متعلق به جنسهای *استرپتوکوکوس*، *استافیلوکوکوس* ، *انتروباکتر* و *سیتروباکتر* می باشند. که در مطالعه حاضر نیز جنسهای *انتروباکتر*(و در یک مرحله) *سیتروباکتر*جدا سازی شده است.

Thayer در سال ۱۹۷۶ نیز گونه های *باسیلوس سرئوس*، *آرتروباکتر* از گونه های مختلف،*آلکالی‌ژنز* از گونه های مختلف و *سراتیما مارسیسنز* را از موریانه های *رتیکولیترمس هسپروس*جدا سازی نموده است که در این مطالعه نیز گونه *باسیلوس اسفریکوس* جداسازی و شناسایی شده است و می تواند نمایانگر این امر باشد که بعضی از جنسها به طور مشترک در گونه های مختلف موریانه وجود دارد و بعضی از گونه های باکتریایی در گونه خاصی غالب می باشند. به عنوان مثال آزمایش بخش انتهایی دستگاه گوارش در موریانه های هوموس خوار *پروکوبی ترمس آبورینسیس* و*کوبی ترمس سوروس* به وسیله میکروسکوپ الکترونی نشان داده که اکتینومیست های شبه باکتریایی فلور میکروبی غالب بوده که همراه با باکتری های غیررشته ای، عمدتاً میله ای بر روی دیواره های بخش ابتدایی پروکتودئال، کولون و سومین بخش پروکتودئال تجمع یافته اند (۱۵). اما به این نکته نیز باید توجه نمود که گونه های یکسان موریانه های جمع آوری شده از مکانهای مختلف دارای جمعیت میکروبی مشابهی هستند، این مسئله نشان می دهد که درجاتی از انتخاب بر بخش انتهایی دستگاه گوارش اثر گذاشته و باکتری هایی که اجازه رشد دارند را تحت تأثیر قرار می دهد. طبیعت بیهوازی بخش انتهایی دستگاه گوارش به این نکته دلالت دارد که باکتری های هوازی اجباری موجود در موریانه ها بخشی از فلور ذاتی نیستند، بلکه احتمالاً همراه با غذا به وسیله موریانه ها خورده شده اند و یا مربوط به آلودگیهایی از سطح خارجی باکتری ها هستند (۴۳). در مطالعه Kato و همکاران در سال ۱۹۹۸ اگر چه به گونه یا جنس باکتری های مورد بررسی اشاره ای نشده، اما نتیجه گرفته شده که باکتری های مستخرجه از روده موریانه های *ناسوتی ترمس تاکاساگوانسیس* می توانند در روده لیگنین را تجزیه نمایند. لذا در مدت زمان انکوباسیون این باکتری ها ۲۸ درصد لیگنین دی آکالیزه و ۶۰ تا ۹۵ درصد از ترکیبات دیمری لیگنین را تجزیه نمودند این آزمایش نشان دهنده وجود باکتری ها در تجزیه لیگنین و تأییدی بر مطالعه حاضر است.

آرتروباکترها که در مطالعات Kerr و همکاران در سال ۱۹۸۳مورد استفاده قرار گرفتند *باسیلوس*که Phelan و همکاران در سال ۱۹۷۹ به آن اشاره نمودند، اکتینومیست های گرمادوست و نوکاردیاها که Crawford در مورد آنها بررسی نمودند (۲۳) و به خصوص سویه های مختلفی از *استرپتومایسزها* که در آزمایشات متعددی به کار گرفته شدند (۱۱،۲۹،۳۳،۳۴،۴۸) همگی حاکی از اهمیت باکتری های تجزیه کننده لیگنین و سلولز در چرخه کربن طبیعت می باشد، اگر چه احتمالاً بخش بسیار ناچیزی از آنها تاکنون مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند.

در مورد میزان و سرعت رشد محققین عنوان نمودند که زمان زادآوری یک باکتری در محیط رشد می تواند برای باکتری های سریع الرشدی مانند اشرشیا کولی فقط به میزان ۲۰ دقیقه در حالی که برای باکتری های آهسته رشدی مانند مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تا ۲۴ ساعت باشد (۴۲). لذا بدیهیترین عامل اثر گذار بر میزان رشد گونه باکتری است. در این مطالعه با توجه به اینکه انتروباکتر متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه* است نسبت به دو گونه دیگر سریع الرشدتر محسوب می گردد. به علاوه عوامل محیطی دیگر از جمله pH، درجه حرارت و ترکیب گازی اتمسفر نیز تأثیر قابل توجهی بر میزان و منحنی رشد دارند. علاوه بر این بالا بودن میزان کلی رشد در انتروباکتر علاوه بر سرعت زادآوری می تواند به تعداد اولیه آن نیز مربوط باشد.

در خصوص دما و pH از آنجایی که هر سه گونه باکتریایی در این مطالعه از یک محیط (دستگاه گوارش موریانه) جمع آوری شده اند احتمالاً از نظر خصوصیت دمایی (مزوفیل با درجه حرارت مناسب بین ۴۰-۲۰ درجه سانتیگراد)، خصوصیت ترکیب گازی (بیهوازی اختیاری) و خصوصیت غذایی (هتروتروف) یکنواخت بوده و احتمالاً تنها خصوصیت اثرگذار بر میزان و نحوه رشد، مشخصات خانوادگی آنها می باشد.

به عنوان مثال داده های Pometto و Crawford در سال ۱۹۸۶ نشان می دهد در حالی که تجزیه و مینرالیزاسیون لیگنو سلولز درشرایط خنثی تا نسبتاً اسیدی بهینه است، محلول شدن لیگنین و تولید APPL (لیگنین پلیمری قابل رسوب کردن در اسید) در شرایط قلیایی بهتر است. در این مورد Kerr و همکاران در سال ۱۹۸۳ که در خصوص تجزیه لیگنین به وسیله باکتری ها در پوسته بادام زمینی که قبلاً با مواد شیمیایی فرآوری شده بودند، گزارش کردند که در بیشتر موارد، رشد بهینه باکتری ها در pH، ۹ صورت گرفته است.

Ogunbiyi در سال ۲۰۰۲ درجه حرارت مناسب برای فعالیت آنزیمهای مؤثر در تجزیه لیگنین (لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز) و بنابر این رشد بیشتر باکتری هایی که تنها منبع کربن مورد استفاده آنها لیگنین بوده را دمای ۴۵ درجه سانتیگراد ذکر نمود. Benner و Hodson در سال ۱۹۸۵ نیز نتیجه گرفتند که در شرایط بیهوازی افزایش درجه حرارت می تواند تجزیه بیولوژیکی لیگنین و مواد لیگنینی شده را افزایش دهد.

Yang و همکاران در سال ۱۹۹۵ که در مورد آنزیم زایلاناز تولید شده به وسیله یک گونه باسیلوس جدا شده از محلول خمیر چوب کاغذ سازی بررسی نمودند نشان دادند که بیشترین تولید آنزیم زایلاناز در pH قلیایی ۹ و ۱۰ بوده است.

در مورد pH Pometto و Crawford در سال ۱۹۸۶ عنوان نمودند که به طور کلی اگر چه قارچهای تجزیه کننده بیشتر تمایل به فعالیت در خاکهای

اسیدی دارند. باکتری ها تمایل به خاکهای قلیایی با pH حدود ۸ داشته و بنابراین رشد آنها در این محیطها بیشتر است.

نتیجه گیری

با استفاده از باکتری های جداشده تجزیه بیولوژیکی کاه گندم و سایر بقایای کشاورزی دارای لیگنین ممکن می شود. آنچه مسلم است دستیابی به سویه های باکتریایی که از توان تجزیه کنندگی بالایی برخوردار باشند نیاز به تحقیقات بیشتر و وسیعتر ضمن استفاده از تکنیکهای جدید از جمله ^{14}C و مطالعه بر روی نوع و میزان آنزیمهای مترشحه دخیل در تجزیه مواد لیگنوسلولزی دارد. داده های این تحقیق نشان داد که در نظر گرفتن شرایط خاص مربوط به باکتری ها از جمله دما، pH، و سرعت و میزان رشد در استفاده از حد اکثر توان فعالیت آنها تأثیر زیادی دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کمکهای بیدریغ ریاست، معاونین، مسؤولین و کلیه همکاران مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان مرکزی، معاونت و همکاران معاونت امور دام استان مرکزی و همکاران مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور قدردانی می نمایم. از همکاریهای مستمر سرکار خانم خانمحمدی نیز صمیمانه تشکر می نمایم.

References

۱. برجی، م. (۱۳۸۰): مکاتبات شخصی با دکتر تی. جی. مایلز در دانشگاه تورنتو.

۲. حبیب پور، ب. (۱۳۷۳): بررسی فون، زیست شناسی و اهمیت اقتصادی موریانه های استان خوزستان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید چمران اهواز.

۳. رنی، ف. و علایی، ا. (۱۳۷۹): بررسی سه عامل فیزیکو- شیمیایی خاک کلنی چهار گونه موریانه در ایران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران.

۴. سلیمان نژادیان، ا. (۱۳۷۰): موریانه ها، تشخیص و مبارزه با آنها (تألیف ویلیام ویکتور هریس). انتشارات مرکز نشر دانشگاهی تهران، صفحه: ۶۹.

۵. عبدالرزاق، ز، عبایی، م.، و یارمند، ح. (۱۳۷۷): بررسی فون موریانه ها و عوامل طبیعی کنترل کننده آنها در مراتع قم. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران.

۶. غیور فر، ر. (۱۳۷۱): فون موریانه های ایران و اهمیت اقتصادی آنها. ماهنامه علمی- تخصصی زیتون. شماره ۱۲۳، صفحه: ۵۴-۵۰.

۷. غیورفر، ر. و محمدی، م. (۱۳۷۹): مطالعه تاکسونومیک موریانه ها با استفاده از تکنیک ژل الکتروفورز (PAGE) آیزوزایم های آنزیم استراز. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران.

۸. غیورفر، رحیم. (۱۳۷۴): انتشار جغرافیایی و مقایسه های مرفولوژیک و میکرومتریک گونه های *Anacanthotermes vagans hagen*, *Anacanthotermes ahngerianus*, *Anacanthotermes turkestanicus jacob* *jacob* در ایران. آفات و بیماریهای گیاهی. شماره ۱و۲، صفحه: ۵۰-۴۰.

9. Adhi, T. P., Korus, R. A. and Crawford, D. L. (1989): Production of major extracellular enzymes during lignocellulose degradaction by two *Streptomycetes* in agitated submerged culture. App. Environ. Microbiol. 55:1165-1168.

10. Alder, E. (1977): Lignin chemistry- past, present and future. Wood Sci. Technol. 11:169-218.

11. Antai, S. P. and Crawford, D. L .(1981): Degradation of softwood, hardwood, and grass lignocelluloses by two *Streptomyces* strains. App. Environ. Microbiol. 42: 378- 380.

12. Ball, A. S., Betts, W. B. and Mccarthy, A. J. (1989): Degradation of lignin- related compounds by *Actinomycetes*. App. Environ. Microbiol. 55: 1642-1644.

13. Bargmeyer, J. R. and Crawford, D. L. (1985): Production and charactterization of polymeric lignin degradation intermediates from two different *Streptomyces* spp. App. Environ. Microbiol. 49: 273-278.

14. Benner, R. and Hodson, E .(1985): Thermophilic anaerobic biodegradation of [^{14}c] lignin, [^{14}c] cellulose, and [^{14}c] lignocellulose preparations. App. Environ. Microbiol. 50: 971-979.

15. Bignell, D. E. Oskarsson, H. and Anderson, J. M.(1979): Association of *Actinomycete*- like bacteria with soil-feeding termites (Termitidae, Termitinae). App. Environ. Microbiol. 37: 339-342.

16. Breznak, J.A. and Brune, A.(1994): Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. Annu. Rev. Entomol. 39: 453-487.

17. Brune, A.(1998): Microbial degradation of aromatic compounds: aerobic versus anaerobic. Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft, 87: 65-78.

18. Burlat, V., Ambert, K. and Ruel, K .(1997): Relationship between the nature of lignin and the morphology of degradation performed by white rot fungi. Plant Physiology and Biochemistry, 35: 645- 654.

19. Buswell, J.A. and Odier, E. (1987): Lignin biodegradation. Critic Review of Biotechnology, 6: 1-60.

20. Butler, J. H. A. and Buckerfield, J. C. (1979): Digestion of lignin by termites. Soil Biology and Biochemistry, 11:507-513.

21. Cappuccino, J.G. and Sherman, N. (1988): Microbiology, a laboratory manual. 5th ed. Benjamin/ cuming science publishing. California, USA. PP: 45-187.

22. Cookson L. J .(1988): The site and mechanism of ^{14}C-lignin degradation *Nasutitexmes exitiosus*. J. Insect. Physiol. 34:409-414.

23. Crawford, D. L. (1974): Growth of *Thermonospora fusca* on lignocellulosic pulps of varying lignin content. Can. J. Microbiol. 20: 1069- 1072.

24. Crawford, D. L.(1978): Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. App. Environ. Microbiol. 35: 1041-1045.

25. Crawford, D. L. and Crawford, R. L. (1976): Microbial degradation of lignocellulose: the lignin components. App. Environ. Microbiol. 31:714-717.

26. Crawford, R. L. and Crawford, D. L.(1978): Radioisotopic methods for the study of lignin biodegradation. Dev. Ind. Microbiol.19: 35-49.

27. Crawford D. L., Floyd, S. and Pometto, A. L. (1977a): Degradation of natural and kraft lignins by the microflora of soil and water. Can. J. Microbiol. 23: 434-440.

28. Crawford, D. L., Crawford, R. L. and Pometto, A. L. (1977b): Preparation of specifically labeled ^{14}C-(lignin) -and ^{14}C-(cellulose)-lignocelluloses and their decomposition by the microflora of soil. App. Environ. Microbiol. 33:1247- 1251.

29. Crawford, D. L., Barder, M. J., Pometto, A. L. and Crawford, R. L. (1982): Chemistry of softwood lignin degradation by *Stereptomyces Viridosporus*. Arch. Microbiol. 131: 140-145.

30. Crawford, D. L., Pometto, A. L. and Crawford, R. L. (1983): Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*: Isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation intermedia. App. Environ. Microbiol. 45: 898-904.

31. Deobald, L. A. and Crawford, D. L. (1987): Activities of cellulase and other extracellular enzymes during lignin solubilization by *Streptomyces viridosporus*. App. Environ. Biotechnol. 26:158-163.

32. Giroux, H., Vidal, P., Bouchard, J. and Lamy, F. (1988): Degradation of kraft indulin lignin by *Streptomyces viridosporus* and Streptomyces badius. App. Environ. Microbiol. 54: 3064- 3070.

33. Godden, B., Ball, A., Helvenstein, P., Mccarthy, A. J. and Penninckx, M. (1992): Towards elucidation of the lignin degradation pathway in *Actinomycetes*. J. Gen. Microbiol. 138: 2441-2448.

34. Godden, B., Legon, T., Helvenstein, P. and Penninckx, M. (1989): Regulation of the production of hemicellulolytic and celluloytic enzymes by a *Streptomyces* sp. Growing on lignocellulose. J. Gen. Microbiol. 135: 285- 292.

35. Hackett, W. F., Connors, W. J., Kirk, T. K. and Zeikus, J. G. (1977): Microbial decomposition of synthetic ^{14}C – labeled lignins in nature: lignin biodegradation in a variety of natural materials. App. Environ. Microbiol. 33:43-51.

36. Haider, K. and Trojanowski, J. (1975): Decomposition of specifically ^{14}C- labeled phenols and dehydropolymers of coniferyl alcohols as models for lignin degradation by soft and white rot fungi. Arch Microbiol. 105: 33-41.

37. Kato, K., Kozaki, S. and Sakuranaga, M. (1998): Degradation of lignin Compounds by bacteria from termite guts. Biotechnology Letters, 20: 459-462.

38. Kerr, T. J., Kerr, R. D. and Benner, R. (1983): Isolation of a bacterium capable of degrading peanut hull lignin. App. Environ. Microbiol. 46: 1201-1206.

39. Lewis, N. G. and Paice, M.G. (1989): Plant cell wall polymers. Washington D. C: American chemical society. PP: 33-88.

40. Manos, C. (1980): Lignin, a complex polymer. Available on: WWW. mbc. pharm. utoledo. edu/mbc/ undergrad courses/ 4480 notes/ manos2. Html.

41. McCarthy, A. J., Paterson, A. and Borda, P. (1986): Lignin solubilisation by *Thermomonospora mesophila*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 347-352.

42. Mohan, C. R. and Manuselis, G. Jr. (1995): Text book of diagnostic microbiology. W. B. Saundres Company USA. PP: 105-170.

43. O'Brien, R. W. and Slaytor, M. (1982): Role of microorganisms in the metabolism of termites. Aus. J. Biol. Sci. 35: 239-262.

44. Odier, E., Janin, G. and Monties, B. (1981): Poplar lignin decomposition by gram- negative aerobic bacteria. App. Environ. Microbiol. 41: 337-341.

45. Odier, E. and Monties, B. (1983): Absence of microbial mineralization of lignin in anaerobic enrichment cultures. App. Environ. Microbiol. 46: 661-665.

46. Ogunbiyi, A. U. (2002): Animal feed produced from sawdust. UK patent Application. Patent number 2367735. PP: 1-2.

47. Phelan, M. B., Crawford, D. L. and Pometto, A.L. (1979): Isolation of lignocellulose- decomposing *Actinomycetes* and degradation of specifically ^{14}C - labeled lignocelluloses by six selected *Streptomyces* strains. Can. J. Microbiol. 25: 1270-1276.

48. Pometto, A. L. and Crawford, D. L. (1986): Effects of pH on lignin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*. App. Environ. Microbiol. 52: 246- 250.

49. Pometto, A. L., Sutherland, J. B. and Crawford, D. L. (1981): *Streptomyces setonii*: catabolism of vanillic acid via guaiacol and catechol. Can. J. Microbiol. 27:636-638.

50. Ramachandra, M., Crawford, D. L. and Hertal, G. (1988): Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic *Actinomycete Streptomyces viridosporus*. App. Environ. Microbiol. 54: 3057-3063.

51. Srinivasan, V. R., Cary, J. W., Chon, Y. and Narva, K. E. (1987): Gene for lignin degradation and uses thereof. United state patent. Patent number: 4713336.

52. Thayer, D. W. (1976): Facultative wood- digesting bacteria from the hindgut of the termite *Reticulitermes hesperus*. J. Gen. Microbiol. 95: 287-296.

53. Yang, V. W., Zhuang, Z., Elegir, G. and Jeffries , T. W. (1995): Alkaline- active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from kraft pulp. J. Ind. Microbiol. 15: 434-441.